

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名:

膜型増殖因子の持つ細胞増殖のアクセル機能とブレーキ解除機能の分子機構の解明

### 2 研究者氏名:

東山 繁樹

### 3 研究のねらい:

細胞が外界から様々なリガンド刺激を受けると膜型増殖因子 Heparin-binding EGF-like Growth Factor (proHB-EGF)が細胞膜表面上で shedding を受ける。shedding によって生じる遊離型細胞外ドメインは、EGF レセプターを活性化して増殖シグナルを惹起する。我々は shedding 後に細胞膜に残る C 末端断片ペプチド(CTF)が速やかに核内に移行し、転写抑制因子と結合しこれを核外に汲み出す反応を誘導することを見出した。これにより、HB-EGF-CTF が遺伝子転写抑制解除機能を持つことを明らかにし、新たなシグナル分子として機能すると共に、新たな細胞増殖シグナル経路が存在することを示した(J. Cell Biol. 163, 489-502, 2003)。本研究では膜型増殖因子が持つ増殖アクセル機能と増殖ブレーキ解除の巧妙な分子機構を明らかにし、細胞増殖分子機構の新たな概念を創出することを研究のねらいとした。

### 4 研究成果:

#### HB-EGF shedding (HB-EGF-CTF 産生) の分子機構

これまでに膜結合型 HB-EGF (proHB-EGF) の shedding の分子機構解明に向けてまず shedding 酵素の同定を行ってきた。さきがけ研究を始めるまでに、proHB-EGF の shedding 酵素として膜型メタロプロテアーゼ ADAM12 を同定していたが(Nature Med. 8: 35-40, 2002)、さらに、他の ADAM ファミリーメンバーの shedding 酵素活性を検討した。ADAM9、10、12、15、17、19 の各遺伝子欠損細胞株を用いて proHB-EGF の shedding を解析した。その結果、proHB-EGF の basal shedding には ADAM10、誘導型 shedding には ADAM17 がさらに関与することを示す実験結果を得た(文献1)。またこれらの ADAM の活性制御機構を明らかにする目的で ADAM の細胞内ドメインに結合する蛋白質の同定を試みた。ADAM12 細胞内ドメインをベイトにし、ヒト心臓の cDNA ライブラリーより酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングした結果、16種類の遺伝子を同定した。ADAM12 細胞内ドメインは4つのプロリンリッチドメインを持つことから、その結合相手と考えられる SH3 ドメインをコードする1つの遺伝子に着目しその cDNA 全長を PCR によりクローニングした。得られた遺伝子は EST データベースでは SH3d19 として登録されている新規の遺伝子であり、ADAM に結合することから Eve-1 と名付けた。

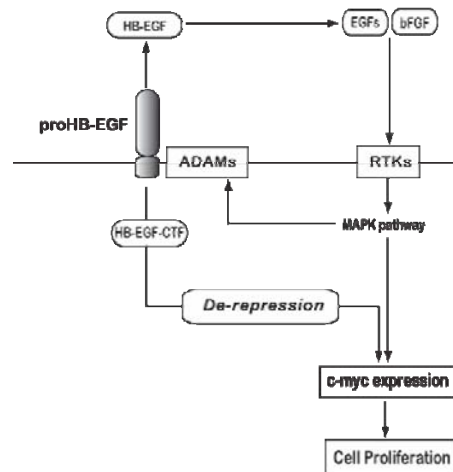
Eve-1 は 767 個のアミノ酸からなる蛋白質で C-末端領域に SH3 ドメインをタンデムに 4 個持つ Eve-1a と、さらにこの分子の中段に 23 アミノ酸の挿入を持つことにより新たな SH3 ドメインを形成し、合計 5 個の SH3 ドメインをもつスプライシングバリエーションの Eve-1b からなる。また、翻訳開始が 371 番目の Met から始まるバリエーションが Eve-1a と Eve-1b に存在し、それぞれ Eve-1c と Eve-1d と名付けた。Eve-1 蛋白質は SH3 ドメインを介して ADAM12 のプロリンリッチドメインと相互作用する。また Eve-1a と Eve-1b は N-末端領域にプロリンリッチドメインを 7 個持ち、この領域は ADAM12 との相互作用するための制御ドメインとして機能することが予測される。Eve-1 の機能を明らかにするために、ADAM12 による HB-EGF のプロセッシングに及ぼす効果を、Eve-1 の特異的 siRNA によるノックダウンにより検討した。siRNA は HT1080/HB-EGF-AP 細胞に効率良く導入され、導入後 48 時間での Eve-1 の遺伝子発現を PCR により検出した結果、顕著に抑制しているのを確認した。この細胞を用いて、フォルボールエステル(TPA) および angiotensin II によって引き起こされる HB-EGF-AP のプロセッシングを処理後 30 分後の培養上清中の AP 活性の検出により検討した。その結果、Eve-1 のノックダウンにより TPA による HB-EGF-AP の shedding は約 70% 抑制された。一方、Eve-1 のノックダウンにより angiotensin II による HB-EGF-AP のプロセッシングは各々約 55% 抑制された。以上の結果から、Eve-1 は TPA ならびに angiotensin II 刺激による HB-EGF shedding

のシグナル経路に位置し、ADAM12 の活性化を正に制御する因子であると推測された(文献 2)。

#### **HB-EGF-CTF による細胞周期および周期関連因子の制御**

1) HB-EGF-CTF と PLZF の細胞周期進行に伴う細胞内局在変化: proHB-EGF の shedding によって産生される HB-EGF-CTF は核に移行し、転写抑制因子 PLZF と相互作用しながらその細胞内局在を核内から核外へと大きく変化させることをこれまでに報告してきた。また、培養細胞系においては細胞周期進行に伴い内在性 proHB-EGF が shedding されることが考えられていたが、その詳細は明らかではなかった。そこで、proHB-EGF shedding のモニタリング用細胞として作製した proHB-EGF-Alkaline phosphatase 発現ヒト繊維芽肉腫細胞株 HT1080 /HB-AP 細胞と HB-EGF と PLZF を内在性にもつ初代培養ヒト表皮角化細胞を用いて、細胞周期一回転における proHB-EGF shedding の反応、HB-EGF-CTF 産生とその細胞内局在変化、ならびに PLZF の細胞内局在変化を、蛍光免疫染色とレーザー स्क্যান サイトメーターにより細胞周期画分解析と細胞内局在を同時に解析することで検討した。その結果、細胞表面 proHB-EGF の shedding は細胞周期 G1 後期で shedding が誘導されることが示された。更に G1 後期により産生される HB-EGF-TMC は S 期と G2 期には核内に集積が認められ、M 期前期では中心体付近に局在する様になる。一方、PLZF は G1 期では核に局在し、S 期には細胞質への移行が観察され、G2 期では完全に細胞質へとその局在を変化させた。これらの観察結果から、HB-EGF-CTF と PLZF の細胞周期進行に伴う局在変化は、予測通りの排他的局在の変化を示した。以上のことから、proHB-EGF の shedding は細胞周期進行と連動し、PLZF の機能解除を誘導する HB-EGF-CTF シグナルが稼働することを示すことができた (文献3)。

2) PLZF による *c-myc* の発現抑制の解除: 細胞増殖因子シグナルの下流に位置し、細胞分裂促進に必須の転写因子 *c-myc* の遺伝子発現が PLZF により抑制されることが報告されている。HB-EGF-CTF が PLZF の機能を解除することから、HB-EGF-CTF シグナルが増殖因子による *c-Myc* 遺伝子発現誘導シグナルの中間に位置するのではないかと考え、*Hb-egf* <sup>-/-</sup> 繊維芽細胞を用いて bFGF, EGF, PDGF による *c-Myc* 遺伝子発現誘導を解析した。まず、野生型繊維芽細胞 (*Hb-egf* <sup>+/+</sup>) で bFGF, EGF, PDGF 刺激により内在性の HB-EGF の shedding が誘導され、HB-EGF-CTF は核移行することを確認した。また、上記各増殖因子受容体からのシグナルは MAP kinase ERK1/2 の活性化で見る限り、*Hb-egf* <sup>+/+</sup> および *Hb-egf* <sup>-/-</sup> 繊維芽細胞で変化はなかった。次に、*Hb-egf* <sup>+/+</sup> および <sup>-/-</sup> 繊維芽細胞を上記各増殖因子により刺激し、*c-Myc* 遺伝子発現を RNA protection assay と定量 PCR により解析した。その結果細胞増殖因子シグナルにより誘導される *c-Myc* 遺伝子発現は *Hb-egf* <sup>-/-</sup> 繊維芽細胞では顕著に抑制されることが明らかとなった。また、*Hb-egf* <sup>-/-</sup> 繊維芽細胞では、*Hb-egf* <sup>+/+</sup> 繊維芽細胞に比べて、EGF と bFGF 増殖因子による細胞周期 S 期への進行が有意に抑制されることが明らかとなった。一方 PDGF による繊維芽細胞の増殖促進には有意さを持った細胞周期 S 期進行の遅延は認められなかった。さらに、*Hb-egf* <sup>-/-</sup> 繊維芽細胞に *Hb-egf* 遺伝子を導入し発現を回復させることで上記各増殖因子による *c-Myc* 遺伝子発現ならびに細胞周期 S 期進行への遅延が回復することを示した。これらの結果から HB-EGF-CTF シグナルが少なくとも EGF ならびに bFGF による *c-Myc* 遺伝子発現誘導において PLZF 等の転写抑制因子の解除に重要な機能をはたしていることを明らかにした。(論文投稿中)



**Figure 1.** A schematic diagram for the proposed role of HB-EGF-CTF signaling in c-Myc transcription induced by growth factor receptor activation.

### HB-EGF-CTF シグナルの破綻と病態

**遺伝子改変マウスの作製から:**これまでに HB-EGF のマウス個体での役割を明らかにするために遺伝子ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、ノックアウトマウスでは発生過程における心臓弁形成に致死的な異常をきたすことを報告してきた (Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 3221-3226, 2003)。さらに、*Hb-egf*<sup>lox/lox</sup> マウスと Tie-2 Cre マウスとの交配で作製した血管内皮特異的に *Hb-egf* 遺伝子を欠損させたマウス、ならびに、SM-22 Cre マウスとの交配で作製した平滑筋細胞特異的に *Hb-egf* 遺伝子を欠損させたマウスを作製し、表現型を解析した。その結果、両マウス共に発生過程における心臓弁形成に致死的な異常をきたし、肥大型心筋症を誘発した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 350, 315-321, 2006)。一方、HB-EGF-CTF 領域を欠失させた遊離型のミュータント HB-EGF の遺伝子ノックインした soluble HB-EGF ノックインマウスはホモ接合体で重篤な肥大型心筋症を引き起こし死に至る。また、shedding 抵抗性のミュータント proHB-EGF の遺伝子をノックインした ucproHB-EGF ノックインマウスでは遊離型 HB-EGF の産生が抑制されていると同時に HB-EGF-CTF 産生も抑制されている。このマウスでは生後8ヶ月までに拡張型心筋症を引き起こし死に至ることを報告してきた (J. Cell Biol. 163, 469-475, 2003)。

また、これまでに proHB-EGF の shedding が皮膚創傷治癒に重要であること報告しており (J. Cell Biol. 151, 209-219, 2000)、これをさらに検討するために、*Hb-egf*<sup>lox/lox</sup> マウスと Keratin 5-Cre マウスとの交配により表皮細胞特異的に *Hb-egf* 遺伝子を欠損させたマウスを作製し、創傷治癒過程における HB-EGF の役割を解析した。Figure 10 と 11 に示す様に、*Hb-egf* 遺伝子欠損マウスでは背中への傷の治癒速度が創傷後7日目まで有意差を持って遅延することが示された(文献4)。

以上の結果から、proHB-EGF ならびに shedding は発生過程での心臓弁形成、ならびにその後の心筋細胞機能維持に必須であること、また表皮層創傷治癒過程で重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、HB-EGF-CTF シグナル本体が心臓弁形成や表皮層創傷治癒過程でどのように機能しているかはこのタイプの解析方法からでは限界があり、新たな技術開発が必要である。

### 5 自己評価:

膜型増殖因子 proHB-EGF が shedding され、細胞増殖アクセルとなる HB-EGF と増殖ブレーキ解除となる HB-EGF-CTF シグナルが EGF や bFGF などの他の増殖因子のシグナル伝達時にも連動して c-myc 遺伝子の発現を制御していることが示すことができたのは、当初の研究の狙いが適切であったと評価している。しかし、shedding は様々な細胞外刺激によって引き起こされる反応であることから、proHB-EGF の shedding のみを誘導したり、HB-EGF-CTF シグナルのみを起動させることは、生理的条件下ではほとんど不可能である。今後、CTF シグナルの解析を進めるため

には、CTF シグナルのみを起動させる新たな技術開発が必要であり、継続して本課題に取り組みたい。また、HB-EGF-CTF が細胞膜から核膜へ局在を変化させるその分子機構の解明には至らなかったが、これも生物学上、重要な課題として提案できたと考えている。今後、この分子機構の解明に迫りたい。

#### 6 研究総括の見解:

膜型増殖因子 proHB-EGF が、細胞外のリガンド刺激で膜型メタロプロテアーゼ ADAMS による切断を受け、細胞外ドメインは細胞増殖因子として機能し、細胞膜に残る C 末端ペプチドは核内に移行して転写抑制因子を核外に追い出すブレーキ解除の機能を発揮する分子機構を明らかにしたことは優れた研究成果と考える。特に、Eve タンパク質、転写因子 PLZF と C 末端ペプチドとの相互作用によるブレーキ解除機能の解明は、東山ワールドを作り出しユニークである。更なる研究展開と、その成果のヒト疾患の理解、克服への応用への貢献を期待する。

#### 7 主な論文等:

##### 原著論文

1. Sahin, U., Weskamp, G., Zhou, H., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Safting, P. and Blobel, C.P.: Distinct roles for ADAM10 and 17 in ectodomain shedding of six EGFR-ligands. **J. Cell Biol.** 164: 769-779, 2004.
2. Tanaka, M., Nanba, D., Mori, S., Shiba F., Ishiguro, H., Yoshino, K., Matsuura, N. and Higashiyama, S.: ADAM-binding protein Eve-1 is required for ectodomain shedding of EGF receptor ligands. **J. Biol. Chem.** 279: 41950-41959, 2004.
3. Toki, F., Nanba, D., Matsuura, N. and Higashiyama, S.: Ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF like growth factor and subcellular localization of the C-terminal fragment in a cell cycle. **J. Cell. Physiol.** 202: 839-848, 2005.
4. Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Mekada, E., Higashiyama, S., and Hashimoto, K.: Heparin-binding EGF-like growth factor is essential for keratinocyte migration in skin wound healing. **J. Cell Science.** 118: 2363-2370, 2005.
5. Shiraishi, K., Yamasaki, K., Nanba, D., Inoue, H., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Hashimoto, K., and Higashiyama, S.: Pbx1 is a major target of PLZF-mediated melanoma cell growth suppression. **Oncogene.** in press, 2006.

他に論文 18 件(国際 18 件)、総説 9 件(国際 3 件、国内 6 件)、口頭発表 8 件(国際 3 件、国内 5 件)

特許出願:なし

受賞:なし

##### 招待講演

1. Shigeki Higashiyama; Ectodomain shedding of membrane-anchored growth factor HB-EGF - new insight in signal transduction; International Symposium on Proteolysis (2003/11/12, Nagoya, Japan)
2. Shigeki Higashiyama; Ectodomain shedding of HB-EGF and novel cell signaling; International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa (2005/1/20, Kanazawa, Japan).
3. Shigeki Higashiyama; Ectodomain shedding of membrane-anchored growth factor HB-EGF by ADAM and HB-EGF-C terminal fragment signaling; The Kennedy institute of Rheumatology Symposium. Metalloproteinases: Biology and Pathology (2005/11/21-22, London, UK)